(Aus der Abteilung für experimentelle Medizin [Leiter: Prof. *A. Krontowski*] am Bakteriologischen Institut zu Kiew [Direktor: Prof. *M. Nestschadimenko*].)

Über die Kultivierung der Gewebe außerhalb des Organismus bei Anwendung der kombinierten Medien.

Von

Prof. **A. Krontowski.**

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Juni 1922.)

Die Methode der Kultivierung tierischer Gewebe außerhalb des Organismus („Explantation" nach der Terminologie von *Roux*), die von *Harrison, Burrows* und *Carrel* ausgearbeitet worden ist, bildet ohne Zweifel eine höchst interessante und wertvolle Errungenschaft in der derzeitigen Methodik experimentell-biologischer Untersuchungen. Nach den grundlegenden Arbeiten der erwähnten Autoren hat sich eine Anzahl von Forschern*) mit einschlägigen Fragen beschäftigt und dabei die Methode der Gewebskulturen zur Lösung verschiedener wissenschaftlicher Probleme angewandt. Bekanntlich hat *Harrison* als erster Gewebsstückchen in einem Tropfen Lymphe gezüchtet; auf diese Weise erzielte er Kulturen von Geweben des Froschembryos in Froschlymphe. *Burrows* und *Carrel* wandten anstatt der Lymphe Blutplasma an: sie kultivierten in einem Tropfen geronnenen Plasmas verschiedene Gewebe von Warmblütern (Vögeln und Säugetieren). Die Methode *Burrows-Carrels***) ist gegenwärtig auch die allgemein übliche, und mit Recht, denn tatsächlich bildet das Blutplasma eines Tieres derselben Art in vielen Fällen ein ausgezeichnetes Medium zur Kultivierung verschiedener Gewebe außerhalb des Organismus. Leider kann dieses Verfahren bei weitem nicht in allen Fällen angewandt werden. So ist dasselbe natürlich nicht

*) Ausführliche Literaturangaben und ein allgemeiner Überblick über die verschiedenen wissenschaftlichen Tatsachen, die sich bei Anwendung der Methode der Gewebskultivierung ergeben haben, finden sich im Buche von *Krontowski* und *Poleff*, „Methode der Gewebskulturen" T. I u. II, S. 398. 1917 (russ.). Ebendaselbst ist auch die Technik der Kultivierung von Geweben in vitro ausführlich beschrieben.

**) Auf verschiedene Modifikationen gehe ich hier nicht näher ein; das alles ist in dem erwähnten Buch von *Krontowski* und *Poleff* schon erörtert; im vorliegenden Aufsatz will ich nur die Methode darlegen, welche in der von mir geleiteten Abteilung für experimentelle Medizin häufig zu verschiedenen Zwecken angewandt wird.

anwendbar, wenn es sich darum handelt, Gewebskulturen von Tieren zu erhalten, die eines Blutgefäßsystems gänzlich ermangeln, und ebenso von denen, deren Blut (bzw. Lymphe oder Hämolymphe) überhaupt nicht gerinnt oder aber nach dem Gerinnen sich bald wieder verflüssigt. Außerdem muß man von dem Verfahren in all den Fällen absehen, wo es nicht gelingt, von dem betreffenden Tier (etwa weil es selbst oder weil seine Gefäße zu klein sind) die nötige Menge ungeronnenen Blutes steril zu gewinnen. Daher schien es mir höchst wünschenswert, die ursprüngliche Methode von *Harrison-Burrows-Carrel* derart zu ergänzen, daß die Schranken ihrer Anwendbarkeit beseitigt und *die Möglichkeit gegeben würde, Gewebe der verschiedensten Tiere in vitro zu kultivieren, ohne Rücksich darauf, ob dieselben nun ein Blutgefäßsystem besitzen oder nicht, ob ihr Blut bzw. ihre Lymphe oder Hämolymphe zum Medium für Gewebskulturen taugt oder nicht.* Insbesondere war es wichtig, *die Möglichkeit zu erlangen, Gewebe von niederen Tieren in vitro zu kultivieren, speziell von Wirbellosen*, da viele derselben schon lange als klassisches Objekt für das Studium grundlegender biologischer Probleme dienen.

Ich beschäftige mich seit dem Jahre 1912, anfangs gemeinsam mit *Poleff*, mit der Kultivierung von Geweben außerhalb des Organismus und habe die obige Methode vielfach beim Studium biologischer und pathologischer Fragen angewandt[12]) [13]) [14]) [15]) [16]). Daneben war ich aber bemüht, eine Methodik auszuarbeiten, die den oben genannten Anforderungen entspräche. Endlich gelang es mir, in vieler Hinsicht befriedigende Resultate zu erzielen, als ich kombinierte Medien anwandte, die nach den unten dargelegten Prinzipien zusammengesetzt waren. Infolgedessen bediente ich mich in den letzten Jahren dieser „kombinierten Medien" in weitestem Umfange und in verschiedensten Fällen, sowohl bei meinen eigenen Arbeiten als auch bei denen, die ich gemeinsam mit meinen Mitarbeitern *v. Schustow*, *Rumjanzew*, *Sparrow*, *Hach*, *Radzimowska*, *Tschertok* u. a. unternahm. So zum Beispiel gelang es *mir* und *Rumjanzew*[19]) Gewebe von Wirbellosen, und zwar von Regenwürmern (Lumbricidae) außerhalb des Organismus zu kultivieren. Bei Versuchen, die von *mir* und *Radzimowska*[18]) angestellt wurden, um den Einfluß der H-Ionen auf das Leben der Gewebszellen festzustellen, ergab die Anwendung kombinierter Medien bessere Resultate als die gewöhnliche Methode. Und ebenso leisteten die kombinierten Medien *mir* und *Hach*[17]) große Dienste beim Studium der biologischen Eigenschaften des Fleckfiebervirus usw. Außerdem wird bei Anwendung kombinierter Medien das Studium mancher Fragen noch dadurch erleichtert, daß man die Einwirkung auf die Gewebskulturen variieren, z. B. die Zusammensetzung der Medien in weiterem Umfange ändern kann usw. In Anbetracht dieser Umstände erlaube ich mir, im folgenden die Methodik und Technik der Kultur von Geweben außerhalb des Orga-

nismus vermittels kombinierter Medien, wie sie in der von mir geleiteten Abteilung für experimentelle Medizin ausgearbeitet sind und in der letzten Zeit angewandt werden, in Kürze darzulegen.

Bei der Zusammensetzung kombinierter Medien ging ich von folgenden Erwägungen aus. Wie die Untersuchungen vieler Forscher gezeigt haben, *müssen die Medien, in welchen Gewebe gezüchtet werden sollen, erstens passendes Nährmaterial enthalten bezw. eine bestimmte biochemische Zusammensetzung aufweisen, und zweitens müssen sie,* wie *Harrison*[10]) u. a. gezeigt haben, abgesehen von allem anderen, *dem wachsenden Gewebe die entsprechende mechanische Stütze bieten* (in völlig flüssigen Medien gelingt die Kultivierung von Geweben bekanntlich meist nicht). Das geronnene Blutplasma entspricht an und für sich schon diesen beiden Grundforderungen. *Wenn sich aber ein entsprechendes fertiges* (natürliches) *Medium für die Gewebe des betreffenden Tieres nicht vorfindet, muß man suchen, die beiden oben genannten Bedingungen für sich gesondert herzustellen: erstens, eine möglichst geeignete Nährflüssigkeit zuzubereiten, und zweitens, dieser die erforderliche Dichtigkeit zu geben, indem man ein entsprechendes Substrat zusetzt.* Für die Fälle, wo man aus den oben angeführten Gründen vom betreffenden Tier kein Blutplasma beschaffen kann, schien es mir zweckentsprechend, die Medien so zusammenzusetzen, *daß die Nährflüssigkeit aus dem Gewebssaft* (Gewebsextrakt u. dgl.) *eines Tieres derselben Art* (oder ebendesselben Tieres), woher auch das zu kultivierende Gewebe stammt, *zubereitet wurde,* und *die erforderliche Konsistenz,* das mechanische Stroma, *ihr durch Zusatz heterogener Plasmen, speziell zu diesem Zwecke gekochten Agars u. dgl. gegeben wurde.* Bei der Zubereitung der Nährflüssigkeit glaubte ich von dem gewöhnlich geübten Kochen von Bouillon absehen zu müssen, da sogar einige Mikroben bekanntlich nur in solchen Medien wachsen, die natives, nicht denaturiertes Eiweiß enthalten. Damit *die Nährflüssigkeit möglichst vollzählig und in möglichst unveränderter Gestalt alle die Stoffe* (natives Eiweiß, Lipoiden, Kohlenhydrate usw.) *enthalte,* die im Protoplasma der Zellen, in der Gewebsflüssigkeit, im Blut des betreffenden Tieres vorkommen, *ist es offenbar zweckentsprechend, solch einen Gewebssaft* (z. B. in Gestalt von „Organplasma", „Preßsaft") *zu benutzen,* der ohne Zusatz von physiologischer Lösung gewonnen ist, oder aber möglichst konzentrierten Extrakt, der durch sorgfältige Zerreibung oder sonstwelche Zerstörung der eigentlichen Zellenelemente unter Zusatz von physiologischer Lösung zubereitet ist (dabei können, wenn es nötig und möglich ist, ausgepreßter Gewebssaft, Blut bzw. Hämolymphe, Serum u. dgl. zugesetzt werden). Um der gewonnenen Nährflüssgkeit die nötige Konsistenz zu geben, kann man ihr verschiedene Plasmen, die aus dem Blute bestimmter Tiere einer anderen Art gewonnen sind, speziell zubereitetes Agar usw. zusetzen.

In praxi wird die Zubereitung kombinierter Medien, die nach den oben erwähnten Grundsätzen zusammengesetzt sind, auf verschiedene Weise, je nach der Beschaffenheit des Materials und einigen anderen Bedingungen, vorgenommen.

Die Nährflüssigkeit kann man herstellen entweder aus zerkleinerten ganzen Tieren der betreffenden Art*) [z. B. aus ganzen Regenwürmern oder Mollusken, wie das bei den Versuchen *Krontowskis* und *Rumjanzews*[19])] der Fall war, oder aus ganzen Embryonen verschiedener Tiere usw.) oder aber aus einzelnen Geweben und Organen von Tieren und Menschen, z. B. aus der Milz, den Muskeln, der Schilddrüse (und anderen Blutdrüsen), der Placenta usw. Den Gewebssaft kann man herstellen entweder mit Hilfe einer gebräuchlichen Presse, die speziell zum möglichst ergiebigen Auspressen von Gewebssaft bestimmt ist, oder aber — was wir meist tun — durch sorgfältiges Verreiben von kleingeschnittenem Gewebe mit pulverisiertem Glas; hernach kann man die zerriebene Masse zentrifugieren oder auspressen, z. B. durch ein feines Kupfernetz, und schließlich filtrieren. Wenn es nicht gelingt, auf diese Weise Gewebssaft zu gewinnen, muß man beim Zerreiben des Gewebes nach und nach ein gewisses Quantum *Ringer*scher Lösung zusetzen. Gewöhnlich benutzen wir *Ringer*sche Lösung, die so zusammengesetzt ist, daß sie dem Tiere der betreffenden Art physiologisch (isotonisch) angepaßt ist (siehe unten). Je weniger Flüssigkeit zugesetzt ist, je konzentrierter der Gewebssaft ist, desto besser gedeihen in ihm gewöhnlich die Kulturen. Wenn die Gewebe, aus denen der Saft bereitet worden ist, nicht steril waren, muß der gewonnene Saft mittels Filtrierung durch eine Chamberland- oder eine Berkefeldkerze sterilisiert werden**). Dieses Filtrieren geht sehr langsam vonstatten; immerhin bekommt man nach einigen Stunden ein gewisses Quantum von Flüssigkeit, das genügt, um eine Menge Gewebskulturen anzulegen. Der durch die Kerze filtrierte und in Reagensgläschen gefüllte Gewebssaft wird gewöhnlich an einem kühlen Orte aufbewahrt.

Indes kann man in vielen Fällen die erwähnte Sterilisierung umgehen, denn aus reinem, nicht bakterienhaltigem Material gelingt es, unter Befolgung der gewöhnlichen Regeln der Aseptik auch unmittelbar sterilen Gewebssaft zu gewinnen. Das läßt sich leicht bewerkstelligen, wenn der Gewebssaft zubereitet wird aus Embryonen von Vögeln, Amphibien, aus Säugetierembryonen, die durch den Kaiserschnitt zutage gefördert sind, aus den inneren Organen des Menschenfoetus u. dgl. Bei erwachsenen Tieren kann man in vielen Fällen einzelne Gewebe und Organe auch steril herausschneiden; alle weiteren Manipulationen müssen aber natürlich unter Befolgung strenger Aseptik vorgenommen werden. Arbeitet man mit der Presse, so muß diese natürlich auch sterilisiert werden. Ebenso kann man vorher auch die Reagensgläschen (der Zentrifuge) mit dem in dieselben geschütteten Glaspulver sterilisieren. Alsdann wirft man Stückchen vom Embryo oder von einzelnen Geweben hinein, fügt, wenn es nötig ist, *Ringer*sche Lösung hinzu und zerreibt das alles mitsamt dem Glase vermittels eines kleinen sterilen Stößels; zuletzt wird alles zentrifugiert. In einigen Fällen kann man schließlich als Nährmaterial auch einige natürliche Flüssigkeit benutzen, die, wenn sie aseptisch gewonnen wird, der Sterilisierung nicht bedarf, so z. B. Blutserum, Hämolymphe, Eiweiß vom Hühnerei u. dgl. m.

---

*) Wenn die Tiere der betreffenden Art allzu klein sind, muß man, um ein genügendes Quantum Gewebssaft zu gewinnen, einige zehn, ja mehrere hundert solcher Tiere nehmen.

**) Nach *Carrels*[3]) Beobachtungen verliert sich die aktivierende Fähigkeit stimulierender Gewebsextrakte (die durch Aufguß gewonnen sind) nach der Filtrierung durch eine Chamberlandkerze vollständig.

Um dem Nährboden (Gewebssaft, Extrakt usw.) die nötige Konsistenz zu geben, kann man in erster Linie Blutplasmen von verschiedenen Tieren anderer Art benutzen. Wie zahlreiche Versuche verschiedener Autoren [*Lambert* und *Hanes*[24]), *Champy* und *Coca*[5]), *Krontowski* und *Schustow*[20]) u. a.] gezeigt haben, sind viele heterogene Plasmen schon an und für sich ohne weitere Zutaten in vielen Fällen durchaus tauglich, um Gewebe von Tieren andere Art in ihnen zu kultivieren. Gewebe des Axolotls wächst z. B. gut im Blutplasma des Pferdes, des Kaninchens, der Katze und des Hundes [*Krontowski* und *Schustow*[20])]. Nicht nur Kulturen vom Gewebe des Embryos, sondern auch des erwachsenen Axolots zeigen ein gutes Wachstum in heterogenen Plasmen: So z. B. wachsen Kulturen aus der Lymphschicht der Leber oder der Milz des Axolotls in Kaninchenplasma ohne Passagen (bei Zimmertemperatur) 30 Tage lang und mehr; dabei haben die Zellen ein völlig frisches Aussehen (Gewebskulturen eigentümliche), normale Struktur des Cytoplasmas und Kerns, und sogar bei 30tägigen Kulturen bemerkt man eine ganze Anzahl frischer, regelmäßig gebildeter Mitosen (s. Abb. 1).

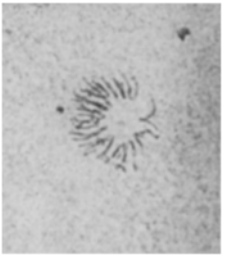

Abb. 1.

Wie mich meine Beobachtungen gelehrt haben, *erzielt man noch bessere Resultate, wenn man heterogene Plasmen dem Gewebssaft oder dem Serum eines Tieres von derselben Art* (oder sogar desselben Individuums), von dem das zu züchtende Gewebe stammt, *nur beimischt.* Unter diesen Bedingungen stehen den zu züchtenden Gewebszellen homologische (oder sogar autologische) Nährstoffe*) zu Gebote.

Um mit heterogenem Plasma ein günstiges Resultat zu erzielen, muß jedenfalls vorher festgestellt werden, ob das verwendete Plasma nicht eine schädliche cytotoxische Wirkung auf das zu kultivierende Gewebe des betreffenden Tieres ausübt [vgl. *Lambert* und *Hanes*[24]), *Champy* und *Coca*[5]) u. a.]. Da sich in dieser Hinsicht keine irgendwie feststehenden Regeln aufstellen lassen**), so muß man in der Praxis für jedes neue Versuchsobjekt empirisch das passendste heterogene Plasma, das keine schädlichen Nebenwirkungen ausübt, aufzufinden suchen. In der Praxis erweisen sich Hühner- und Pferdeplasma, gewissermaßen auch Kaninchenplasma in den meisten Fällen als durchaus tauglich zur Kultivierung von Geweben der verschiedenartigen Tiere. Damit nach dem Gerinnen des zugesetzten Plasmas das Medium sich in eine feste und doch auch genügend zarte, gallertartige Masse verwandelt, muß der Nährflüssigkeit ein gleiches oder etwas

*) Welcher Meinung man über die Bedeutung des Milieus für die Ernährung der in vitro kultivierten Zellen [vgl. *Burrows* und *Neymann*[2])] auch sein mag, jedenfalls empfiehlt es sich, bei der Zubereitung des Mediums demselben homologische oder autologische Stoffe zuzusetzen.

**) Die taxonomische Nähe der Tiere gibt in dieser Hinsicht nicht immer verläßliche Fingerzeige.

geringeres Quantum von Plasma zugesetzt werden*). Außer „reinem Plasma", das in eisgekühlten paraffinierten Reagensgläschen gewonnen ist, kann man, um dem Medium Konsistenz zu geben, auch „Oxalatplasma" [z. B. nach dem von *Krontowski* und *Poleff*[14]) [15]) [16]) beschriebenen Verfahren] anwenden, was in einigen Fällen die Methodik vereinfacht, besonders wenn vorher ein Vorrat von Oxalatplasma hergestellt ist, das sich lange Zeit hält**).

Um der Nährflüssigkeit die nötige Konsistenz zu geben, *eignen sich in den meisten Fällen heterogene Plasmen* z. B. zur Kultivierung von Geweben des Axolotls [*Krontowski* und *Schustow*[20])], von Menschengeweben [*Krontowski* und *Hach*[17])] usw.; in anderen Fällen dagegen geben das beste Resultat Kombinationen aus Gewebssaft und Agar, z. B. um Gewebe von Regenwürmern zu kultvieren [*Krontowski* und *Rumjanzew*[19])].

Wenn wir, um der Nährflüssigkeit Konsistenz zu geben, Agar zu verwenden beabsichtigen, zerkleinern wir es zuerst (nachdem es, wenn nötig, vorher in gewöhnlichem, fließendem, nachdem in destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen ist) und kochen es gewöhnlich in vereinfachter Ringerscher Lösung allein von solch einer Zusammensetzung, daß das Quantum und gegenseitige Verhältnis der Salze NaCl, KCl und $CaCl_2$ den Geweben des Tieres der betreffenden Art physiologisch entspricht. Um dem neutralen Agar eine schwach alkalische Reaktion über den Neutralpunkt hinaus zu geben, wird 0,02—0,1 proz. $NaHCO_3$ zugesetzt. Natürlich kann man die Zusammensetzung des Agars auch noch in anderer Weise komplizieren, so z. B. durch Zusatz von Pepton, Glucose usw. Als Vorrat fertigen wir am häufigsten 1 proz. Agar an, weil dieses bei der Herstellung von Gewebskulturen sich am besten mit der Nährflüssigkeit vermischen läßt. Nachdem dieses Agar zu gleichen Teilen mit der Nährflüssigkeit vermischt worden ist, enthält das Medium im Durchschnitt ungefähr 0,5% Agar (wir nehmen auch etwas weniger Agar, wenn es sich nämlich um Gewebe von Kaltblütern handelt, die bei Zimmertemperatur kultiviert werden). Im allgemeinen muß dem Medium so viel *Agar zugesetzt* werden, daß ein Tropfen der Mischung zu einer *möglichst zarten gallertartigen Masse erstarrt.* Die Verwendung von Gelatine hat bei uns bisher keine günstigen Resultate ergeben.

Die kombinierten Medien, die nach den dargelegten Prinzipien zusammengesetzt waren, wurden von uns, wie schon gesagt, zu den verschiedenartigsten Zwecken verwandt. Um ein konkretes Beispiel dafür zu geben, wie die kombinierten Medien von uns zur Erzielung von *Gewebskulturen von Wirbellosen* verwandt wurden, führe ich die Versuche von Gewebskulturen von Regenwürmern (Allolobophora, Lumbricus) an, die von *mir* und *Rumjanzew*[19]) angestellt worden sind.

*) Bei der Zubereitung von Medien für Gewebskulturen muß man auch den osmotischen Druck in Betracht ziehen [*Carrel* und *Burrows*[4]), *Lambert*[21]), *Ebeling*[7])]. In den Fällen, wo Grund zur Annahme vorliegt, das heterogene Plasma und das mit ihm zubereitete Medium könnte für das zu kultivierende Gewebe hypertonisch sein, muß man daher das Plasma mit etwas destilliertem Wasser verdünnen oder aber den Gewebsextrakt mit hypotonischer Lösung zubereiten, so daß das Medium schließlich isotonisch oder etwas hypotonisch wird.

**) Vielleicht ist für diesen Zweck auch Citratplasma verwendbar, wie es von *Fort*[8]) empfohlen wird.

Da in diesem Falle die gewöhnliche Methode von *Harrison-Burrows-Carrel* nicht anwendbar war, so bedienten wir uns kombinierter Medien. Behufs Zubereitung der Nährflüssigkeit schnitten wir von einigen 10 Regenwürmern die Vorenden (9—10 Segmente) ab, verrieben diese abgeschnittenen Stückchen sorgfältig mit Glaspulver und setzten ein ganz geringes Quantum Ringerscher Lösung zu; außerdem wurden aus den übriggebliebenen Hinterenden der Gewebssaft und Blutflüssigkeit ausgepreßt. Die so gewonnene Flüssigkeit wurde zentrifugiert und durch eine Chamberlandkerze filtriert. Um dem Medium Konsistenz zu verleihen, setzen wir bei den Versuchen mit Würmern Blutplasma vom Pferde und vom Hunde hinzu, desgleichen Agar, das nach der obigen Anweisung gekocht war. Die Kombinationen mit Agar ergaben bessere Resultate. Nehmen wir ein Beispiel. In Kulturen, die aus Wachstumsknospen am Hinterende von jungen Regenwürmern (Lumbricidae) genommen sind, bildet sich bei Zimmertemperatur schon am 3. Tage um das eingepflanzte Stückchen eine ziemlich breite Zone von Zellen (siehe Abb. 2); selbst wenn ziemlich verdünnter Ge-

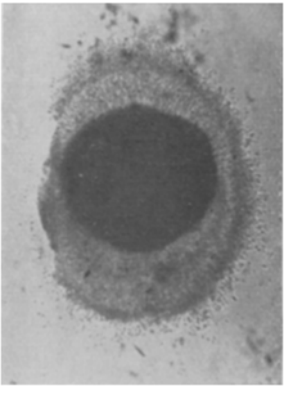

Abb. 2.

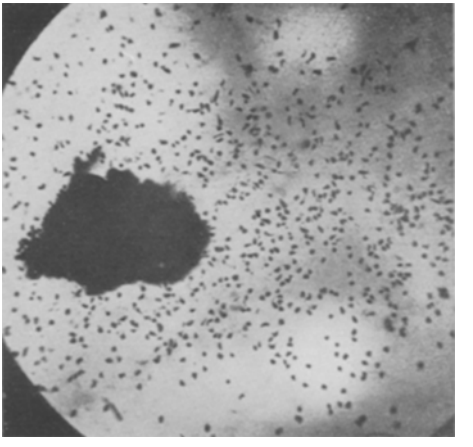

Abb. 3.

websextrakt (1 : 10) verwendet ist, können trotz ihres langsameren Wachstums Kulturen aus Regenerationsknospen des amputierten Vorderendes von Würmern am 7. Tage einen bedeutenden Umfang erreichen. In solch einem kombinierten Medium geht auch die Auswanderung von Zellen gut vonstatten. „Chloragogenzellen" z. B. in Kulturen von Gefäßstückchen des Regenwurms zeigen interessante biologische Eigenheiten: sie wandern energisch aus dem explantierten Stückchen aus und können durch das ganze Medium bis an den Rand wandern (siehe Abb. 3); dabei ist bei starker Vergrößerung deutlich zu sehen, daß der Körper der Chloragogenzellen eine birnenförmige Gestalt annimmt und gewöhnlich einen verlängerten Ausläufer hat, an dessen Ende häufig eine Art von Büschel auftritt, der aus fadenförmigen beweglichen Protoplasmaausläufern besteht; siehe *Krontowski* und *Rumjanzew*[19a])

Goldschmidt[9]) hat bei seinen äußerst interessanten Untersuchungen über die Spermatogenese in vitro die Methode der Gewebskulturen auf die Geschlechtselemente der Wirbellosen angewandt. Er kultivierte Stückchen von Geschlechtsdrüsen eines Schmetterlings einfach in einem Tropfen Hämolymphe und hielt sich dabei an das ursprüngliche Verfahren von *Harrison*. Um aber eine genügende Menge

von Blut steril gewinnen zu können, wählte er als Versuchsobjekt Samia cecropia L. Obgleich diese Art nach Angabe des Autors selbst kein so günstiges cytologisches Objekt bildet wie einige andere Lepidoptera, so enthalten die äußerst großen Puppen dieser Art, abgesehen von allem anderen, doch außergewöhnlich viel Blutflüssigkeit. Ich glaube, unsere oben beschriebene Methode bietet die Möglichkeit, eine größere Anzahl verschiedenartiger, in irgendeiner Hinsicht interessanter Objekte in den Kreis der Untersuchungen zu ziehen, ohne Rücksicht darauf, ob aus ihnen eine genügende Menge Blut resp. Hämolymphe steril gewonnen werden kann oder nicht.

Lewis[25]) untersuchte die Verwendbarkeit von Medien, die mit Meerwasser zubereitet waren, für Gewebskulturen und stellte dabei auch Versuche an, Gewebe einiger Wirbelloser (Limulus, Seeanemone usw.) zu kultivieren. Das Medium bestand aus Bouillon, die aus den Muskeln des betreffenden Tieres gekocht und dann sterilisiert worden war, und aus verdünntem Meerwasser + 0,02 proz. $NaHCO_3$ + 0,1—0,5 proz. Dextrose. Solch ein Medium kann aber, da es flüssig ist, schwerlich als günstig für das Wachstum von Gewebskulturen gelten [vgl. *Harrison*[10]) u. a.]. Außerdem werden beim Kochen des Mediums viele Bestandteile desselben (vor allem verschiedene Arten von Eiweiß) denaturiert (siehe oben) und nachher völlig wegfiltriert.

In einigen Fällen bestand das Hindernis für eine erfolgreiche Kultur der Gewebe von Wirbellosen und niederer Wirbeltiere darin, daß *ihr Plasma bzw. die Hämolymphe nicht gerinnt.* Dieser Umstand war z. B. der Grund, warum *Frl. Dobrowsolsky*[6]), die an der Zoologischen Station in Neapel arbeitete, kein Gewebe vom Octopus und von anderen Tieren in vitro züchten konnte. Auch für diese Fälle paßt die oben beschriebene Methode, und wenn die Gewebe des betreffenden Tieres nur überhaupt genügende Fähigkeit zur Proliferation besitzen, kann man des Erfolges sicher sein.

Kombinierte Medien können auch in den Fällen zustatten kommen, wo *das Plasma* des Tieres zwar die Fähigkeit zu gerinnen besitzt, sich aber nachher *wieder schnell verflüssigt*, wie das z. B. *Dobrowsolsky*[6]) vom Plasma des Haifisches gezeigt hat und viele andere Autoren vom Blutplasma des Menschen. Zur Aufzucht von menschlichem Gewebe in vitro haben *ich* und *Hach*[17]) unter Beachtung der oben dargelegten Prinzipien kombinierte Medien benutzt. Als Nährflüssigkeit verwandten wir hierbei einen Extrakt (nach *Carrel* zubereitet) aus der Milz eines neugeborenen Menschen und aus der menschlichen Placenta oder das Serum eines erwachsenen Menschen; dazu setzten wir dann heterogene Plasmen hinzu. Vermittelst solcher Medien kultivierten wir z. B mit Erfolg Milz und Unterhautzellengewebe eines Neugeborenen und erzielten gute Kulturen von Leukocyten aus dem Blute eines erwachsenen Menschen (vgl. *Aurorow* und *Timofejewskij*[1])]. Da ein besonderer Unterschied im Wachstum der Gewebe in Medien mit Gewebsextrakten und mit Serum nicht zu bemerken war, so ist es der Einfachheit halber natürlich bequemer, eine Kombination aus Serum und Plasma zu benutzen; dabei ergab Hühnerplasma, in Übereinstimmung mit *Lamberts*[22]) Angabe,

auch bei unseren Versuchen gute Resultate; freilich zeigte sich ein recht gutes Wachstum auch in Kaninchenplasma. Im allgemeinen können wir auf Grund unserer Beobachtungen am Wachstum von menschlichem Gewebe in vitro uns der von *Lambert*[22]) speziell für diese Zwecke empfohlenen Technik anschließen, nämlich Hühner- oder Taubenplasma dem menschlichen Serum (oder Plasma) zuzusetzen.

Die angeführten Tatsachen zeigen, daß *die oben dargelegten Prinzipien, komb nierte Medien zusammenzusetzen, für die Kultivierung von Geweben außerhalb des Organismus wohl verwendbar sind, mögen die Gewebe nun von Wirbellosen, von Wirbeltieren oder speziell von Menschen stammen.* Daraus geht hervor, daß *bei Anwendung eines und desselben Laboratoriumsbetriebs und durch Beachtung eines einheitlichen Planes hinsichtlich der Methodik, die verschiedenartigsten Objekte zur Untersuchung herangezogen werden können.*

Natürlich sind noch mannigfache weitere Untersuchungen erforderlich, um im einzelnen klarzulegen, ob eine solche Methodik für alle Tiere, für alle Gewebe usw. verwendbar ist.

In der letzten Zeit werden in meinem Laboratorium verschiedene kombinierte Medien, die nach dem oben dargelegten allgemeinen Plane zu speziellen Zwecken zusammengesetzt worden sind, auch in den Fällen verwandt, wo man gute Gewebskulturen auch einfach im Plasma des betreffenden Tieres erzielen könnte. Abgesehen davon, daß im Gewebsextrakt und Plasma oder, was einfacher ist, im Serum und Plasma die Gewebe besser wachsen als im Plasma allein oder im Plasma, das mit Ringerscher Lösung (oder Aq. destill.) verdünnt ist, so bietet die *Anwendung der genannten Medien in einigen Fällen noch Vorzüge von sozusagen methodologischer und technischer Art.* So brauchten *ich* und *Hach*[17]) zu den Versuchen, die wir behufs Studiums der biologischen Eigenschaften des Fleckfiebervirus anstellten, manchmal gleichzeitig eine ungeheure Anzahl von Kulturen (200—350 einmal in einem Plasma) aus verschiedenen Organen eines mit Fleckfieber infizierten Meerschweinchens. Da das Meerschweinchenplasma in dieser Menge zu beschaffen schwierig war, bedienten wir uns desselben nur in beschränktem Maße und verwandten hauptsächlich eine Mischung von Gewebsextrakt oder noch häufiger von Meerschweinchenserum mit Kaninchenplasma, das in größerer Menge leichter zu beschaffen ist. In solch einem Medium entwickelten die Gewebskulturen ein prächtiges Wachstum und — was die Hauptsache ist — erhielten ihre Virulenz, so daß es z. B. *durch Impfung* verhältnismäßig wenigen 5tägigen *Kulturen immer gelang, bei den Meerschweinchen Fleckfieber hervorzurufen* (mit typischer Temperaturkurve, charakteristischen Fleckfieberknötchen im Gehirn und in den inneren Organen usw.), während die Impfung mit Organstückchen, die 5 Tage lang bei Körpertemperatur in Ringer-

lösung aseptisch aufbewahrt worden waren, niemals zu einer Erkrankung führte.

In den Versuchen, die von *mir* und *Radzimowska*[18], ausgeführt wurden, um den Einfluß der H-Ionen (und einiger anderer Ionen) auf das Leben der Gewebszellen zu untersuchen, hatte die Anwendung kombinierter Medien einen anderen Sinn. Bei diesen Versuchen setzten wir Stückchen einer Kaninchenmilz beispielsweise 30 Minuten lang der Einwirkung einer Mischung aus (z. B. aus Milchsäure und milchsaurem Natrium mit H-Ionen in verschiedener Konzentration, die durch Gasketten bestimmt wurden). Nachher wurden die Stückchen aus solchen Mischungen herausgenommen, in Ringerlösung ausgewaschen, direkt auf Glas gebracht (auf dem sie nachher gezüchtet wurden) und sofort mit einem Tropfen Kaninchenserum bedeckt, das dank seinen regulierenden Eigenschaften die Wirkung der H-Ionen zum Stillstand brachte. So lag ein jedes Stückchen, das verschiedenen Einflüssen ausgesetzt worden war, in einem Serumtropfen bis zum Ende des Versuches; dann wurden alle gleichzeitig*) mit Plasma bedeckt, so daß die Gewebe sich in einer dem Wachstum förderlichen Mischung von Serum und Plasma befanden. Dank solch einer Methodik konnten wir feststellen, daß die Zellen der Kaninchenmilz lebendig geblieben waren und noch Wachstum in vitro entwickelten, nachdem sie 30 Minuten lang der Einwirkung von Mischungen ausgesetzt waren, in denen die H-Ionen folgende Konzentration aufwiesen: Bei Mischung mit Milchsäure – $[H^{\cdot}] = 1{,}7 \cdot 10^{-5}$ ($P_H = 4{,}74$, durch Gasketten bestimmt wurde) oder in vielen Fällen sogar $P_H = 4{,}04$; bei Mischung mit Essigsäure $P_H = 5{,}33$; wie die späteren Versuche mit HCl von *Radzimowska* gezeigt haben, erfolgt das Wachstum der Milzkulturen selbst nach der Einwirkung der Lösungen mit der Konzentration von H-Ionen $P_H = 3{,}24$. Bei unseren Versuchen mit Alkalien erwies sich als Grenzkonzentration $P_H = 10{,}28$ (*Krontowski-Radzimowska*[18]). Hierbei stellte es sich heraus, daß die *Fibroblasten eine solche Konzentration von H-Ionen*, welche die *Emigration von Wanderelementen*, wie der Lymphocyten und retikulären Polyblasten, *völlig hemmt, verhältnismäßig gut ertragen*. Während die Milz in vitro gewöhnlich gut gedeiht, wobei das Wachstum sich in einer schleunigen Auswanderung einer ungeheuren Anzahl von Wanderelementen kund gibt (s. Abb. 4), bemerkt man, wenn sie der Einwirkung einer Mischung mit H-Ionen in einer obigen nahekommenden Konzentration ausgesetzt wird, daß nur die Fibro-

*) Im entgegengesetzten Falle müßte man im Verlaufe des Versuchs mehrere Male den Kaninchen Blut entnehmen, um Plasma zu erhalten. Da die Resultate der Kultivierung ferner in hohem Grade von den Eigenschaften des Plasmas abhängen, die physischen Eigenschaften desselben aber bei verschiedenen Kaninchen und sogar bei ein und demselben Kaninchen stark variieren können, so erhält man am ehesten zur Vergleichung geeignete Resultate, wenn man in allen Versuchen einer Serie ein und dasselbe Plasma verwendet.

blasten an einzelnen Stellen des gezüchteten Stückchens (s. Abb. 5a)*) wachsen und eine Auswanderung der Wanderzellen fast ganz fehlt; der letztere Umstand an den Stellen besonders deutlich bemerkbar (z. B. b an Abb. 5), wo keine Fibroblasten vorhanden sind. In den Versuchen *Tschertoks*, die in meinem Laboratorium vorgenommen wurden, wurden kombinierte Medien angewandt, um festzustellen, wie verschiedene Antiseptica, die sich in dem die wachsenden Zellen umschließenden Medium vorfanden, auf die lebenden Zellen einwirken. Ich beschränke mich auf die angeführten Beispiele, um die Mannigfaltigkeit der Fälle zu illustrieren, in denen wir kombinierte Medien benutzen, und will nur noch darauf hinweisen, daß auch in vielen anderen Beziehungen die Anwendung von Medien, die nach

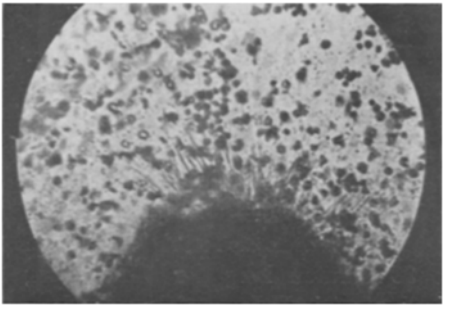

Abb. 4.

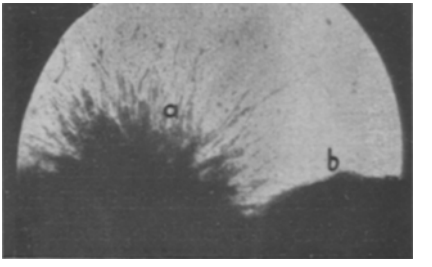

Abb. 5.

den erwähnten Prinzipien zusammengesetzt sind, große Dienste leisten würde.

Als Ergänzung zu den obigen Darlegungen möchte ich noch besonders erwähnen, daß bei Anfertigung von Gewebskulturen vieler Tiere, besonders der Wirbellosen, der Umstand große Schwierigkeiten bietet, daß sowohl die Deckhäute als auch die Innengewebe bei vielen von ihnen oft stark mit Bakterien beschmutzt sind und es daher unmöglich ist, ein steriles Organstückchen oder -gewebe aus ihnen aseptisch herauszuschneiden; infolgedessen werden die angefertigten Kulturen, noch ehe sie zu wachsen anfangen, schnell durch Mikroben verunreinigt.

Diesen Schwierigkeiten zu begegnen und dabei praktisch befriedigende Resultate zu erzielen, ist uns auf zweierlei Weise gelungen: Entweder wuschen wir das Objekt in vielfach gewechselter steriler *Ringer*scher Lösung sorgfältig ab und befreiten es auf diese Weise von einer ansehnlichen Menge von Mikroben, oder aber wir benutzten verschiedene Antiseptica. Die Anwendung desinfizierender Mittel besonders zu vermeiden, dazu liegt wahrscheinlich kein genügender Grund vor. Direkte Versuche haben gezeigt, daß, *obgleich das Leben der Gewebszellen im Organismus der Wirbeltiere zwar in einem inneren Milieu verfließt*, das sich dank den bekannten, von *Höber*[1]) so genannten *„physiologischen Konstanten" durch seine Beständigkeit auszeichnet, daß aber die Gewebszellen an und für sich nicht be-*

*) Dieses Mikrophotogramm stammt von der 10tägigen Kultur eines Stückchens von einer Kaninchenmilz, die vorher der halbstündigen Einwirkung einer Mischung (mit Milchsäure) $P_H = 4{,}44$ ausgesetzt war.

sonders empfindlich für die vorübergehende Veränderung der äußeren Bedingungen sind und eine bedeutende Widerstandsfähigkeit gegen verschiedene physische und chemische Einwirkungen besitzen. Wenn man z. B. ein Stückchen Milz für eine halbe Stunde (oder auch etwas länger) in destilliertes Wasser (Aq. bisdestill.) legt, so erleidet das Gewebe eine auch für das unbewaffnete Auge leicht wahrnehmbare, deutlich ausgeprägte Veränderung; trotzdem ist aber ein solches Stückchen, wie meine Versuche gezeigt haben, wachstumsfähig, wenn es in vitro gezüchtet wird; halbstündiges Liegen in einer 3—5 proz. NaCl-Lösung, die auch von stärkerer Konzentration*) sein kann, tötet die Milzzellen nicht. Die oben angeführten Versuche haben erwiesen, daß Gewebszellen ihre Lebensfähigkeit erhalten und in Kulturen wachsen können, nachdem sie zeitweilig der Einwirkung ziemlich saurer Lösungen ausgesetzt waren, in denen $[H^{\cdot}] = 0{,}7 \cdot 10^{-4}$ (bis $P_H = 4{,}04$), wie die Versuche von *Krontowski* und *Radzimowska*[11]) gezeigt haben. Gegen die Einwirkung vieler chemischer Stoffe zeigten sich die Gewebszellen in hohem Grade resistent. Nach den Untersuchungen *Lamberts*[23]) blieben Zellen von Lymphdrüsen und von der Milz des Menschen am Leben, auch wenn sie eine Stunde lang der Wirkung von 10 proz. Alkohol, 0,2 proz. Phenol, einer Jodlösung von 1 : 1500, einer Sublimatlösung von 1 : 40 000 ausgesetzt gewesen waren. Nach den in meinem Laboratorium angestellten Versuchen entwickeltem Wachstum in vitro (nach einer 10 Minuten langen Einwirkung): Zellen des Hühnerembryos — nach einer Carbolsäurelösung 1 : 200, nach einer Sublimatlösung 1 : 10 000 (*Sparrow*); Zellen der Kaninchenmilz — nach einer Carbolsäurelösung 1 : 500, nach einer Jodlösung 1 : 1000 (*Tschertok*) usw. In Anbetracht dieser Tatsachen sind wir beim Beschaffen von Gewebsstückchen aus verschiedenen Tieren nicht so sehr darauf bedacht, auf jeden Fall Antiseptica zu vermeiden. Das gewählte Objekt (ein ganzes Tier oder ein Teil seiner Deckhaut) wird zuerst mit gewöhnlichem Wasser gehörig abgewaschen; dann desinfizieren wir seine Oberfläche (z. B. mit Spiritus, Jod, Sublimatlösung, die nachher mit einer entsprechenden sterilen Lösung abgewaschen wird); hernach waschen wir dasselbe, wenn es nötig ist, vielfach mit steriler *Ringer*scher Lösung und schneiden schließlich die nötigen Stückchen heraus. Manchmal muß man auch die Oberfläche des herausgeschnittenen beschmutzten Organs oder Gewebes mit einer antiseptischen Lösung bearbeiten, aber nur leicht, so daß die innen liegenden Zellen, die hernach zur Kultivierung herausgeschnitten werden sollen, dadurch nicht geschädigt werden. Oder aber wir kommen auch ganz ohne Desinfektionsmittel aus und schneiden aus dem mit Wasser und mit steriler physiologischer Lösung gründlich abgewaschenen Tier die nötigen Stückchen heraus, die hernach wieder vielfach in steriler *Ringer*scher Lösung gewaschen werden [*Krontowski* und *Schustow*[20])]. In allen Fällen, überhaupt wo wir die herausgeschnittenen und zur Kultivierung zubereiteten kleinen Gewebsstückchen nicht für unbedingt steril halten, waschen wir diese Stückchen vor dem Einpflanzen in den Nährboden in mehreren Gefäßen (z. B. Petrischalen) nacheinander mit einem reichlichen Quantum steriler *Ringer*scher Lösung, die den Geweben des Tieres der betreffenden Art physiologisch angemessen ist. *Durch Anwendung der erwähnten 2 Mittel erreichen wir es, daß, wenn das zur Kultur bestimmte Material ursprünglich auch nicht steril war, viele Kulturen doch bakterienfrei bleiben.* Mittels dieses Verfahrens gelingt es in vielen Fällen auch, Gewebsstückchen sowohl von Landtieren, wie z. B. Regenwürmern, als auch von Wassertieren, z. B. regenerierenden Planarien, zu beschaffen, die, in den Nährboden gepflanzt, nicht mit Mikroben bewachsen [*Krontowski* und *Rumjanzew*[19])].

Wie aus den angeführten Tatsachen ersichtlich ist, gewährt die oben

*) Die Fibroblasten sind nach halbstündigem Liegen in einer NaCl-Lösung sogar in einer Konzentration bis 10% noch wachstumsfähig.

dargelegte Methodik die Möglichkeit, mit den verschiedenartigsten Objekten zu arbeiten; sie erweitert das Gebiet, auf dem die Methode der Gewebskulturen angewandt werden kann, und erlaubt, Versuche nach verschiedenen Richtungen hin auszuführen. Im allgemeinen ist die Kultivierung der Gewebe außerhalb des Organismus nach dem Grundverfahren von *Harrison-Burrows-Carrel* und unter Zuhilfenahme verschiedener kombinierter Medien unzweifelhaft eine sehr wertvolle Methode zum Studium vieler biologischer und medizinischer Fragen.

Zusammenfassung.

Aus den obigen Darlegungen möchte ich folgende Punkte als besonders wichtig hervorheben:

1. In den Fällen, wo zur Herstellung von Kulturen aus den Geweben irgendeines Tieres, speziell eines wirbellosen, aus irgendwelchen Gründen sein Blutplasma (Lymphe bzw. Hämolymphe) nicht benutzt werden kann, ist es dennoch möglich, Gewebe außerhalb des Organismus zu kultivieren, wenn man nämlich kombinierte Medien verwendet.

2. In nach einheitlichem Prinzip kombinierten Medien, in denen als Nährmaterial Gewebssaft („Organplasma", „Preßsaft"), Gewebsextrakt, Serum u. dgl. dient, die aus demselben Tier gewonnen sind, und in denen die nötige Konsistenz des Mediums durch Zusatz von heterogenen Blutplasmen, von besonders zubereitetem Agar usw. hergestellt wird, gelingt es, sowohl Gewebe von Wirbellosen (z. B. Lumbricidae) als auch von Wirbeltieren (z. B. Menschen) zu kultivieren.

3. In einigen Fällen, selbst wenn die Möglichkeit verhanden ist, Gewebe in Pla ma des betreffenden Tieres zu kultivieren, können kombinierte Medien beim Studium einzelner Spezialfragen (wie in den erwähnten Versuchen zur Erforschung der biologischen Eigenschaften des Fleckfiebervirus, zur Feststellung des Einflusses von H-Ionen auf das Leben der Gewebszellen usw.) gewisse Vorzüge besitzen.

Literaturverzeichnis.

[1]) *Awrorow* und *Timofejewskij*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **216**. 1914 und Russ. Arzt. 1915, Nr. 24. — [2]) *Burrows* und *Neymann*, Journ. of exp. med. **25**. 1917. — [3]) *Carrel*, Journ. of exp. med. **17**. 1913. — [4]) *Carrel* und *Burrows*, Journ. of exp. med. **13**. 1911. — [5]) *Champy* und *Coca*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **77**. 1914. — [6]) *Dobrowolsky*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **79**. 1916 und Arch. des sciences biol. **20**. 1916. — [7]) *Ebeling*, Journ. of exp. med. **17**. 1913. — [8]) *Fort*, Journ. of the Americ. med. assoc. 1916. — [9]) *Goldschmidt*, Arch. f. Zellforsch. **14**. 1917. — [10]) *Harrison*, Journ. of exp. zool. **17**. 1914 (zit. nach Ref. in Journ. of R. microscop. society **4**. Aug. 1915). — [11]) *Höber*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 16. — [12]) *Krontowski*, Über die Kultivierung der Gewebe außerhalb des Organismus vermittelst kombinierter Medien. Vortrag, gehalten am 12. XII. 1919 in der Neurussischen Naturforscher-Gesellschaft (Odessa). — [13]) *Krontowski*, Beitrag zur Biologie der außerhalb des Organismus

lebenden Gewebszellen. Ibidem. — [14]) *Krontowski* und *Poleff*, Ärztliche Zeitung (russ.) 1913, Nr. 27, 28 u. 29. — [15]) *Krontowski* und *Poleff*, Beitr. z. pathol. Anat. u. z. allg. Pathol. **58**. 1914. — [16]) *Krontowski* und *Poleff*, Methode der Gewebskulturen, T. I u. II. 1917 (russ.). — [17]) *Krontowski* und *Hach*, Studien über die biologischen Eigenschaften des Fleckfiebervirus vermittelst der Methode der Gewebskulturen (im Druck). — [18]) *Krontowski* und *Radzimowska*, The Journal of Physiologie **56**, 5. 1922. — [19]) *Krontowski* und *Rumjanzew*, Zur Frage über die Kultivierung von Geweben Wirbelloser außerhalb des Organismus. Protokolle der Zoolog. Abteilung der Moskauer Gesellschaft der Naturforscher 1920. — [19a]) *Krontowski* und *Rumjanzew*, Pflügers Arch. **195**, Heft 4/5. 1922. — [20]) *Krontowski* und *Schustow* [zit. nach dem Buch von Krontowski und Poleff[16])]. — [21]) *Lambert*, Journ. of exp. med. **19**. 1914. — [22]) *Lambert*, Journ. of exp. med. **24**, Nr. 4. 1916. — [23]) *Lambert*, Journ. of exp. med. **24**, Nr. 6. 1916. — [24]) *Lambert* und *Hanes*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **211**. 1913. — [25]) *Lewis*, Anat. Rec. **10**. 1916.